

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C07H 21/00, 19/04 C07F 9/26		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 85/ 00816 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Februar 1985 (28.02.85)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP84/00244 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 1984 (10.08.84) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 33 29 892.0 (32) Prioritätsdatum: 18. August 1983 (18.08.83) (33) Prioritätsland: DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KÖSTER, Hubert [DE/DE]; Hallerstrasse 74, D-2000 Hamburg 13 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SINHA, Nanda, Dual [IN/DE]; Julius-Vosseler-Str. 32, D-2000 Hamburg 54 (DE). (74) Anwälte: GLAWE, Richard; Postfach 26 01 62, (DE) usw.		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING OLIGONUCLEOTIDES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN <div style="text-align: center;"> $\text{R}^3 - \text{O} - \text{P} \begin{array}{l} \diagup \text{X} \\ \diagdown \text{L} \end{array} \quad (\text{III})$ </div>			
(57) Abstract <p>Process for producing oligonucleotides with the following steps: transformation of a nucleoside with a phosphine derivative, transformation of the phosphine derivate thus obtained with a nucleoside connected to a carrier polymer, oxidation of the nucleosidonucleotide connected to a carrier and obtained during the formation of phosphotriester groups, masking of free primary 5'-OH groups, separation of a protector group from the terminal 5'-OH group, optionally repeating once or a plurality of times the above-mentioned steps in order to obtain other units of nucleoside phosphates or oligonucleoside phosphates, separation of the nucleoside-carrier bound and, optionally, separation of all protector groups present in the oligonucleoside phosphates. As a phosphine derivative, is used a compound having the general formula (III), wherein X and L may react with OH groups of the sugar units of the oligonucleotides and wherein R³ is a protector group releasable by β-separation.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden mit folgenden Schritten: Umsetzung eines Nucleosids mit einem Phosphin-Derivat, Umsetzung des so erhaltenen Nucleotid-Derivats mit einem an einen polymeren Träger gebundenen Nucleosid, Oxidation des so erhaltenen trägergebundenen Nucleosidonucleotids unter Ausbildung von Phosphotriestergruppen, Maskierung freier primärer 5'-OH-Gruppen, Abspaltung einer Schutzgruppe von der terminalen 5'-OH-Gruppe, gegebenenfalls ein- oder mehrfache Wiederholung der vorgenannten Schritte zur Einführung weiterer Nucleosidphosphat- oder Oligonucleosidphosphateinheiten sowie Spaltung der Nucleosid-Trägerbindung und gegebenenfalls Abspaltung aller in der Oligonucleosidphosphaten vorhandenen Schutzgruppen. Als Phosphin-Derivat kommt eine Verbindung der allgemeinen Formel (III) zur Anwendung, in der X und L mit OH-Gruppen der Zuckereinheiten der Oligonucleotide reagieren können und R³ eine unter β-Eliminierung freisetzbare Schutzgruppe ist.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KR	Republik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BE	Belgien	LF	Sri Lanka
BG	Bulgarien	LU	Luxemburg
BR	Brasilien	MC	Monaco
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MG	Madagaskar
CG	Kongo	MR	Mauritanien
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumänien
FI	Finnland	SD	Sudan
FR	Frankreich	SE	Schweden
GA	Gabun	SN	Senegal
GB	Vereinigtes Königreich	SU	Soviet Union
HU	Ungarn	TD	Tschad
JP	Japan	TG	Togo
KP	Demokratische Volksrepublik Korea	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Beschreibung

Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden der im Anspruch 1 angegebenen allgemeinen Formel I. Die erfindungsgemäß hergestellten Oligonucleotide weisen definierte Sequenzen auf und können als spezifische Primer und Probes eingesetzt werden bzw. sind für die Synthese kompletter Gene von großer Bedeutung (Arzneimittelforschung 30, 3a, 548, (1980)).

Oligonucleotide werden nach dem neusten Stand der Technik entweder nach der Phosphat- oder Phosphittriestermethode unter Verwendung polymerer Träger hergestellt (Nachr. Chem. Tech. Lab. 29, 230 (1981)). Um definierte Sequenzen aufbauen zu können, müssen die einzelnen Bausteine (Nucleoside bzw. Nucleotide) mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Hier werden für den Schutz der exocyclischen Aminogruppen der heterocyclischen Nucleobasen allgemein basenlabile Acylgruppen, für die Verankerung der Oligonucleotidkette mit dem polymeren Träger in üblicher Weise eine basenlabile Esterbindung und für den Schutz der primären 5'-OH-Gruppe die säurelabilen Tritylethergruppen verwendet. Als Phosphatschutzgruppe der Phosphattriestermethode wird üblicherweise entweder die 2-Chlorphenyl- oder 4-Chlorphenylgruppe in esterartiger Bindung verwendet, die nur durch den Angriff einer Base oder eines Nucleophils am Phosphoratom entfernt werden kann. Ein solcher Schritt ist an sich unerwünscht, da damit



die Gefahr einer Spaltung der internucleotidischen Phosphatesterbindung gegeben ist. Diese Gefahr wurde durch die Verwendung von Oximat-Anionen (Tetrahedron Lett. 19, 2727 (1978)) stark reduziert, obwohl diese auch im entscheidenden Schritt in unerwünschter Weise am Phosphoratom angreifen und darüberhinaus den Nachteil aufweisen, daß eine verhältnismäßig geringe Menge an erwünschtem Oligonucleotid mit sehr großen Mengen an nicht flüchtigen und schwer extrahierbaren Salzen verunreinigt ist. Dies erschwert nicht nur die Aufarbeitung und nachfolgende Reinigung des synthetisierten Oligonucleotids, sondern führt auch zu erheblichen Substanzverlusten.

In der Phosphittriestermethode wird üblicherweise die Methylgruppe in esterartiger Bindung als Phosphat-schutzgruppe verwendet, die durch Angriff eines Nucleophils am Methyl-C-Atom entfernt werden kann (J. Amer. Chem. Soc. 99, 3526 (1977)). Da ein Angriff am P-Atom vermieden wird, wird die Gefahr einer Spaltung der Internucleotidbindung ebenfalls vermieden. Als Nucleophil wird üblicherweise Thiophenol/Triethylamin verwendet, die unangenehm zu handhaben sind und außerdem zu nicht flüchtigen, schwer extrahierbaren Verbindungen führen, die - wie oben erwähnt - sowohl die Aufarbeitung erschweren als auch zu erheblichen Materialverlusten führen.

Obwohl die eigentliche Synthese von Oligonucleotiden nach der Festphasen-Phosphit- bzw. Phosphattriestermethode recht effizient und schnell verläuft, ist die Herstellung von Oligonucleotiden definierter Sequenz nach wie vor sehr zeitaufwendig. Dies liegt vor allem an den Problemen der nachfolgenden Aufarbeitung und Reinigung, die ein Mehrfaches der eigentlichen Syntheszeit beanspruchen. An diesem Punkt setzt das Verfahren der Erfindung ein, das hier



eine entscheidende technische Verbesserung bietet.

Um zu Verbindungen der im Anspruch 1 angegebenen Formel I zu gelangen, in denen B eine Nucleobase, z.B. Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) oder Uracil (U) oder deren Analoga und R^1 Wasserstoff, Hydroxyl bzw. mit in der Nucleotidchemie üblichen Schutzgruppen geschütztes Hydroxyl sowie n eine ganze Zahl von 1 bis 200 bedeuten, sind erfindungsgemäß verschiedene, definierte Reaktionsschritte durchzuführen:

- a) Umsetzung eines Nucleosids der allgemeinen Formel II.

R^1 der allgemeinen Formel II kann Wasserstoff sein; es handelt sich dann bei den Verbindungen der Formel I um Oligodesoxynucleotide. Die Gruppe R^1 kann auch Hydroxyl- oder gegebenenfalls mit in der Nucleotidchemie üblichen Schutzgruppen geschütztes Hydroxyl sein. Derartige Schutzgruppen sind z.B. Trityl, Monomethoxytrityl und Dimethoxytrityl, Acyl, z.B. Acetyl, Benzoyl; Tetrahydropyranyl, Methoxytetrahydropyranyl, o-Nitrobenzyl sowie Silylether wie z.B. t-Butyl-Diphenylsilylether. Eine allgemeine Übersicht über in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppen findet sich z.B. in Tetrahedron 1981, Seite 363 - 369, Liebigs Ann. Chem. 1978, 839 - 850, sowie Nucleic Acids Research, Symposium Series No. 7, 1980, 39 - 59.

R^2 ist ebenfalls eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe gemäß den vorgenannten Veröffentlichungen, vorzugsweise die säurelabile 4,4-Dimethoxy- oder 4,4,4-Trimethoxytritylgruppe. B' kann ebenfalls eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe gemäß den oben genannten Vorveröffentlichungen aufweisen.



4

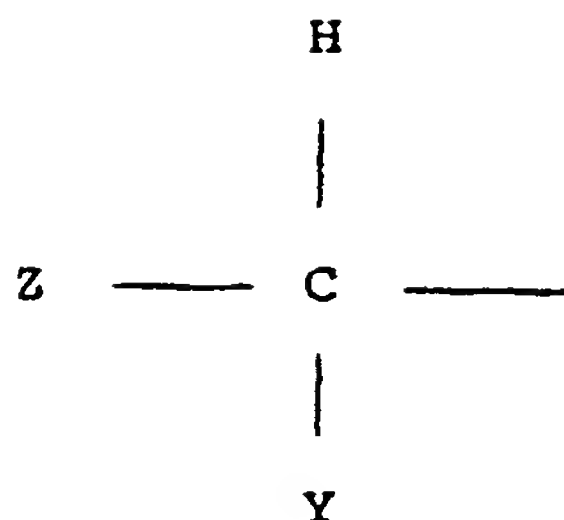
Das Nucleosid der Formel II wird erfindungsgemäß mit einem Phosphinderivat der allgemeinen Formel III gemäß Anspruch 1 umgesetzt.

In der allgemeinen Formel bedeutet X Chlor, Brom, CN oder SCN; L bedeutet Chlor, Brom, CN, SCN oder einen Aminrest der Formel $-NR^4_2$ (Formel VIII), wobei die Gruppen R^4 primäre, sekundäre oder tertiäre Alkyreste mit 1 - 10 Kohlenstoffatomen sind oder zusammen einen Cycloalkylrest mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls mit Alkylverzweigungen, und/oder einem oder zwei Stickstoff-, Sauerstoff- und/oder Schwefelatom als Heteroatome enthalten kann, bedeuten.

Die Gruppe L kann auch einen reaktiven heterocyclischen Rest bilden, der Imidazolyl, Triazolyl, Tetrazolyl, 3-Nitro-1,2,4-triazolyl, Thiazolyl, Pyrrolyl, Benztriazolyl (gegebenenfalls mit Substituenten im Phenylrest) oder Benzhydroxytriazolyl (gegebenenfalls mit Substituenten im Phenylring) und dergleichen bilden.

R^3 des Phosphinderivats der allgemeinen Formel (III) ist erfindungsgemäß eine mit Hilfe von Basen durch β -Eliminierung entfernbare Gruppe der allgemeinen Formel VII, in der Y Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet. Z stellt eine elektronenziehende Gruppe dar, z.B. Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, CN, NO_2 . Z kann weiterhin Phenyl, Phenylthio, Phenylsulfoxy oder Phenylsulfonyl bedeuten, wobei die Phenylreste in o, o'-Stellung und/oder p-Stellung mit Halogen, CN oder NO_2 substituiert sein können. Anstelle der Gruppe

5



kann auch eine der Gruppen CF_3 , CCl_3 oder CBr_3 stehen.

Die Umsetzung gemäß Schritt a erfolgt in Gegenwart einer organischen Base.

b) Umsetzung des in Schritt a erhaltenen Nucleosid-phosphorigsäure-Derivates der Formel IV.

Die Umsetzung der Verbindung gemäß Formel IV erfolgt mit einem an einen polymeren Träger gebundenen Nucleosid der allgemeinen Formel V gemäß Anspruch 1. Es können lösliche oder unlösliche, d.h. vernetzte, polymere Träger verwendet werden, z.B. modifiziertes Silicagel, Glas, insbesondere "controlled pore glass", Polyester, Polyamid, Polyvinylalkohol, Polysiloxan, Polystyrol oder dergleichen. Als Verankerungsfunktion zwischen Träger und Nucleosid kommen vorzugsweise Esterbindungen in Betracht, einschließlich solcher, die sich von Äävulinyll- oder β -Benzoylpropionylrest ableiten; die letztgenannten Esterbindungen können unter neutralen Bedingungen mit Hydrazin gespalten werden. Auch die säurelabile Trityletherbindung, gegebenenfalls mit Substituenten in den Phenylringen, kommt als Verankerungsmöglichkeit in Betracht, vgl. Liebigs Ann. Chem. 1974, 959.

c) Oxidation des in Stufe b erhaltenen trägergebundenen Nucleotidonucleosids der allgemeinen Formel VI.

Die Oxidation führt zu einer Phosphatgruppe; sie kann z.B. mit Jod/H₂O, H₂O₂ oder organischen Persäuren oder allgemein durch Oxidation durch Einführung von O, S oder Se durchgeführt werden.

d) Maskierung freier primärer 5'-OH-Gruppen, die bei der Reaktion gemäß Stufe b (im Produkt der Formel V) nicht umgesetzt wurden.

Diese freien Hydroxylgruppen werden mit einer permanenten Schutzgruppe maskiert, z.B. durch Reaktion mit Acetanhydrid.

e) Abspaltung der Schutzgruppe(n) R²

Die Abspaltung erfolgt beispielsweise unter Verwendung



7

einer Protonsäure oder Lewissäure wie ZnBr_2 oder Dialkylaluminiumchlorid, wenn R^2 eine Tritylgruppe oder Methoxyderivat derselben darstellt.

f) Einführung weiterer Nucleosidphosphat- oder Oligonucleosidphosphateinheiten

Die Stufen a - e können wiederholt werden, wobei mindestens ein Nucleosidphosphatrest eingeführt wird. Beim Einsatz von Oligonucleosidphosphateinheiten werden selbstverständlich Kettenverlängerungen um mehr als eine Nucleosidphosphateinheit erreicht.

g) Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen

Diese Abspaltung kann in der Weise erfolgen, daß mit wässrigem Ammoniak in einem Schritt die N-Acylgruppen der heterocyclischen Basen, die Esterbindung zwischen Oligonucleotid und Träger (gegebenenfalls kann letztere unter neutralen Bedingungen auch mit Hydrazin gespalten werden) und die Phosphatschutzgruppe gemäß dem allgemeinen Schema 1 am Schluß der Beschreibung durch β -Eliminierung abgespalten werden. Es wird dann ein Oligonucleotid mit nur 5'-terminaler Tritylschutzgruppe erhalten, das in an sich bekannter Weise nach Entfernung der flüchtigen Base (Ammoniak) direkt durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an "reversed phase"-Material gereinigt werden kann.

Die Zwischenprodukte der allgemeinen Formel IV gemäß Anspruch 1 stellen neue Verbindungen dar. Sie liegen in Form recht stabiler, in reiner Form darstellbarer Verbindungen vor, sind leicht zu handhaben und dennoch recht reaktiv im Sinne der Knüpfung von Internucleotidbindungen. Der Einsatz von R^3 als eine durch Basen über β -Eliminierung



entfernbarer Schutzgruppe ermöglicht es zum ersten Mal, bis auf die 5'-Tritylgruppe alle Schutzgruppen in einem Schritt abzuspalten, wobei vorteilhafterweise durch Verwendung flüchtiger Basen das gewünschte Oligonucleotid in nur sehr geringem Maße mit Fremdstoffen verunreinigt ist und damit direkt nachfolgend durch die noch vorhandene hydrophobe 5'-Tritylgruppe über "reversed phase"-HPLC gereinigt werden kann.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens der Erfindung ergibt sich daraus, daß durch die Entfernung der Schutzgruppe durch β -Eliminierung kein Angriff am P-Atom erfolgt und damit an keiner der neu geknüpften Internucleotidbindungen während des Entschützens gespalten werden kann. Das Verfahren der Erfindung führt damit bei stark reduziertem Zeitaufwand zu insgesamt reineren Produkten als die bisher verfügbaren Verfahren.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen näher erläutert, wobei Phosphinderivate zur Anwendung kommen, in denen R^3 ein β -Cyanethylgruppe ist. Einzelheiten der Reaktion und physikalische Kenndaten der hergestellten Verbindungen ergeben sich aus den Schemata 2 und 3, der Tabelle 1, sowie den Figuren 1 - 7 am Schluß der Beschreibung.

Beispiel 1:

Herstellung von Phosphinderivaten der allgemeinen Formel III:

Monochlor- β -cyanethyl-phosphoramidite:

Eine allgemeine Übersicht über die Reaktion ist aus Schema 1 ersichtlicht.

Dichlor- β -cyanethoxyphosphin (1) wird mit einigen Verbesserungen



9

im übrigen jedoch wie in Can. J. Chem. 58, 2686 (1980)) dargestellt:

137,5 g (1,0 Mol) PCl_3 werden in einem Dreihalskolben mit Tropftrichter mit 300 ml Ether und 79,0 g (1 Mol) Pyridin versetzt; die Mischung wird auf -78° unter Argon abgekühlt. Dann wird eine Lösung von 71,0 g (1 Mol) 8-Cyanethanol in 150 ml trockenem Ether tropfenweise über 1 bis 1,5 Stunden gegeben. Das Kältebad wird entfernt; man rührt weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur (unter Umständen werden erneut 300 ml Ether zugegeben, um eine bessere Rührfähigkeit zu gewährleisten). Rührer und Tropftrichter werden unter Argon entfernt; das Gemisch wird über Nacht bei 0°C aufbewahrt. Die festen Salze werden unter Argon entfernt; der Niederschlag wird zweimal mit je 75 ml Ether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum konzentriert; der Rückstand wird schließlich im Vakuum destilliert: Siedepunkt $70 - 75^\circ \text{C}/0,4 \text{ mm}$.

Monochlor-8-cyanethylphosphoramidite (3):

Zu einer Lösung des N-trimethylsilylierten sekundären Amins (0,1 Mol) oder sekundären Amin (0,2 Mol) in 30 ml Ether wird tropfenweise bei -20°C unter Argon eine Lösung von 17,2 g (0,1 Mol) 8-Cyanethylphosphordichloridit (1) in 60 ml Ether im Verlauf von 1 bis 1,5 Stunden zugetropft. Nach 20stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Aminhydrochlorid entfernt; die verbleibende Lösung wird konzentriert. Der Rückstand wird schließlich im Vakuum in einer Kurzwegdestille destilliert.

Die physikalischen Eigenschaften der so erhältlichen Verbindungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Figuren 1a, 1b und 1c zeigen ^{31}P -NMR-Spektren von drei verschiedenen Monochlor-8-cyanethylphosphoramiditen.



Das N-Morpholinderivat ist thermisch zu instabil, um destilliert werden zu können. Die Präparation ist dennoch so rein, daß der Rückstand direkt für die Herstellung der aktivierten Nucleosid-Derivate verwendet werden kann. Die Reinheit ist gewöhnlich entsprechend den ^{31}P -NMR-Spektren größer als 95%.

Nucleosid-8-cyanethylphosphoramidite:

Die Darstellung der entsprechend geschützten Nucleosid-8-cyanethylphosphoramidite ist aus Schema 3 ersichtlich.

Die Synthese gelingt in Analogie zu Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981) mit einigen Verbesserungen in guten Ausbeuten.

3.0 m Mol des N-geschützten 5'-dimethoxytritylierten Desoxynucleosids werden mit THF/Toluol azeotrop getrocknet, in 15 ml trocknen THF gelöst und mit 12,0 m Mol N, N, N-Diisopropylethylamin zugegeben. Zu dieser Lösung werden unter kräftigem Rühren tropfenweise im Verlauf von 2 Minuten unter Argon 6,0 m Mol des Monochlor-8-cyanethylphosphoramidits zugefügt. Nach kurzer Zeit (2 bis 5 Minuten) fällt Aminhydrochlorid aus. Die Suspension wird für weitere 30 bis 40 Minuten gerührt. Aminhydrochlorid wird unter Argon abfiltriert und gründlich mit trockenem THF (10 bis 15 ml) nachgewaschen. Die gesamte organische Phase wird konzentriert und in Argon-gesättigtem Ethylacetat gelöst (100 ml). Die organische Phase wird zweimal mit je 50 ml Argon-gesättigter 10%-wässriger Natriumcarbonatlösung extrahiert. Die organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck zu einem Schaum eingedampft. Der Schaum wird mit wenig Ethylacetat oder Toluol aufgelöst und in n-Hexan bei -78°C gefällt. Die aktivierten Nucleoside sind stabil für mehrere Monate, wenn man sie unter Argon bei -20°C aufbewahrt.



//

Figur 2 zeigt das ^{31}P -NMR-Spektrum eines der aktivierten Desoxynucleoside.

Synthese von d(CGGTACCG)

100 mg "controlled pore glass" (CPG), beladen mit insgesamt 8 μ Mol N-Isobutyryl-desoxyguanin (vgl. Tetrahedron Lett. 24, 747 (1983)) wird nacheinander mit den 5'-dimethoxytritylierten N-acylierten 8-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramiditen der Desoxynucleoside C, C, A, T, G, G und C kondensiert, wobei jeweils 20 bis 25 Äquivalente des Phosphoramidites in Acetonitril mit jeweils 75 - 80 Äquivalenten sublimiertem Tetrazol aktiviert werden. Die Kondensationen sind nach längstens 30 Minuten beendet; die Kopplungsausbeute beträgt mehr als 94%. Nach der Kondensation folgt jeweils eine Oxidation mit $\text{J}_2/\text{H}_2\text{O}$ und Maskierung nicht umgesetzter 5'-OH-Gruppen mit Acetanhydrid. Anschließend erfolgt Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe entweder mit 3% Trichloressigsäure in Nitromethan/1% Methanol oder ZnBr_2 /Nitromethan/1% H_2O .

Die Gesamtausbeute des geschützten Oktanucleotids am Ende aller Kondensationsschritte beträgt 55%, bezogen auf das trägergebundene Desoxyguanosin.

Die vollständige Entschützung und Abspaltung vom Träger wird in einem Schritt durch Umsetzung der Glasperlen mit konzentriertem wässrigen Ammoniak (3 ml) bei 50° C in 16 Stunden erreicht. Anschließend werden die Glasperlen gründlich mit 50% wässrigem Methanol gewaschen (3 mal mit je 3 ml). Die flüssige Phase wird durch Einengen (Entfernung des Methanols) und Gefriertrocknung entfernt. Anschließend wird ein Aliquot nach Filtration durch Millipore-Filter durch HPLC an RP 18 gereinigt, wie aus Figur 3 ersichtlich ist.



Die Fraktionen, die das 5'-dimethoxytritylierte Oligonucleotid enthalten, werden gesammelt; der flüchtige Puffer wird im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mit 1 ml 80%-iger Essigsäure versetzt. Die Essigsäure wird nach 45 Minuten bei Raumtemperatur durch Gefrier-trocknung entfernt.

Das so erhaltene Material wird in üblicher Weise (Liebigs Ann. Chem. 1978, 982) mit T4-Polynucleotidkinase und γ -³²P-ATP phosphoryliert. Das erhaltene Produkt wird durch Polyacrylamidgelelektrophorese im Vergleich zu einem Homo-oligo-dT-Wellenlängenstandard (Nucleic Acids Res. 6, 2096 (1979) (Figur 4) und gemäß Figur 5 durch Sequenzierung (Liebigs Ann. Chem. 1978, 982) charakterisiert.

Die Figuren 6a bis 6c zeigen die Ergebnisse (HPLC, Gelelektrophorese, Sequenzierung) der Synthese von d (GGGATCCC) unter Verwendung der Nucleosid- β -cyanethyl-N,N-dimethylphosphoamidite. Die Figuren 7a bis 7c zeigen die Ergebnisse (HPLC, Gelelektrophorese, Sequenzierung der Synthese von d (GGGATATCCC) unter Verwendung der Nucleosid- β -cyanethyl-N-morpholinophosphoamidite.

Die in den Figuren 3, 6a und 7a wiedergegebenen Ergebnisse wurden durch Anwendung eines Gradienten von 10 -25 Vol.-% CH₃CN, 5 min., und 25 - 29 Vol.-% CH₃CN, 30 min. in 0,1 M Triethylammoniumacetat bei pH 7,0 erhalten.

Tabelle 1: Physikalische Daten von Monochlor- β -cyanethylphosphoramiditen

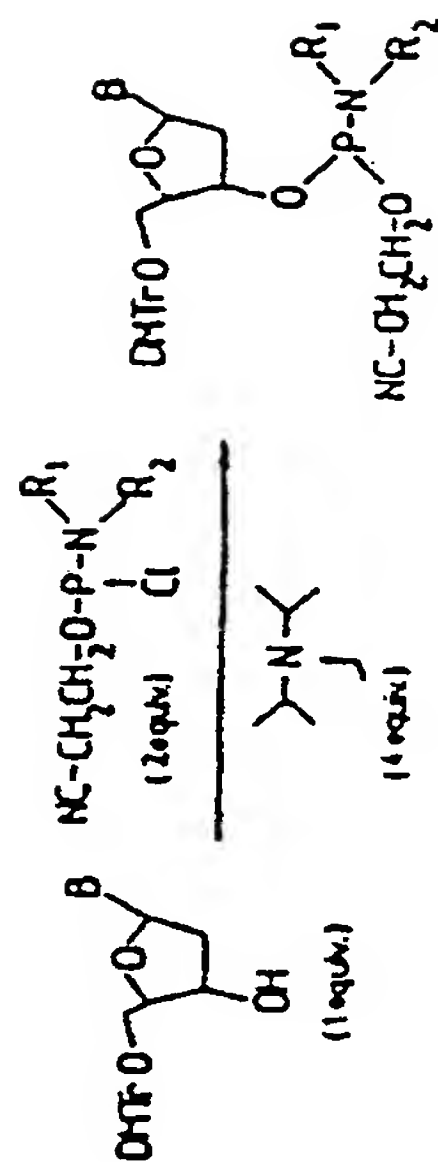
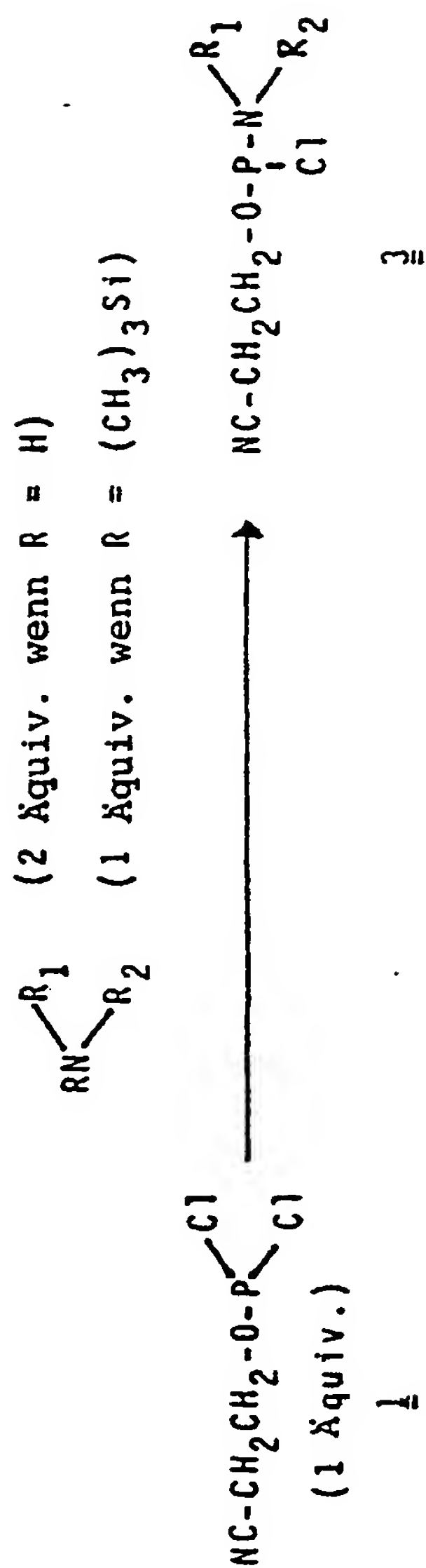
Verbindung	3a L = N,N-Dimethylamino	3b L = N,N-Diisopropylamino	3c ¹⁾ L = N-Morpholino
Siedepunkt	90-92°/0.6 mm	103-5°/0.08 mm	-----
Chemischer Shift ²⁾ für ³¹ P-NMR in CH ₃ CN	175,97 ppm	179,82 ppm	168,22 ppm
Chemischer Shift für ¹ H-NMR in ppm	4.01, 4.17 (2t, P-OCH ₂ , 2H) 2.71 (t, -CH ₂ -CN, 2H) 2.7 (d, N(CH ₃) ₂ , 6H)	4.02, 4.2 (2t, POCH ₂ , 2H) 3.8 (m, N(CH ₂) ₂ , 2H) 2.77 (t, -CH ₂ CN, 2H) 1.29 (d, N-CH(CH ₃) ₂ , 12H)	3.96, 4.1 (2t, POCH ₂ , 2H) 3.67 (t, O(CH ₂) ₂ , 4H) 3.17 (m, P-N(CH ₂) ₂ , 4H) 2.74 (t, CH ₂ -CN, 2H)
Massenspektrum	($\frac{m}{e}$) ⁺ =180, 182 (+2), 145 (-Cl), 136 (-C ₂ H ₆ N), 110 (-C ₃ H ₄ NO)	($\frac{m}{e}$) ⁺ =236, 238 (+2), 201 (-Cl), 166 (-C ₃ H ₄ NO), 136 (-C ₆ H ₁₄ N)	($\frac{m}{e}$) ⁺ =222, 224 (+2), 187 (-Cl), 152 (-C ₃ H ₄ NO), 136 (-C ₄ H ₈ O)

1) Das Rohprodukt weist nach Abtrennung von Aminhydrochlorid und von im Hochvakuum bei Raumtemperatur flüchtigen Verbindungen nach dem ³¹P-NMR-Spektrum eine Reinheit von 93-95% auf.

2) Die chemischen Shifts sind in Aceton-d₆ mit 80%-iger H₃PO₄ als externem Standard gemessen.



Schema 2.

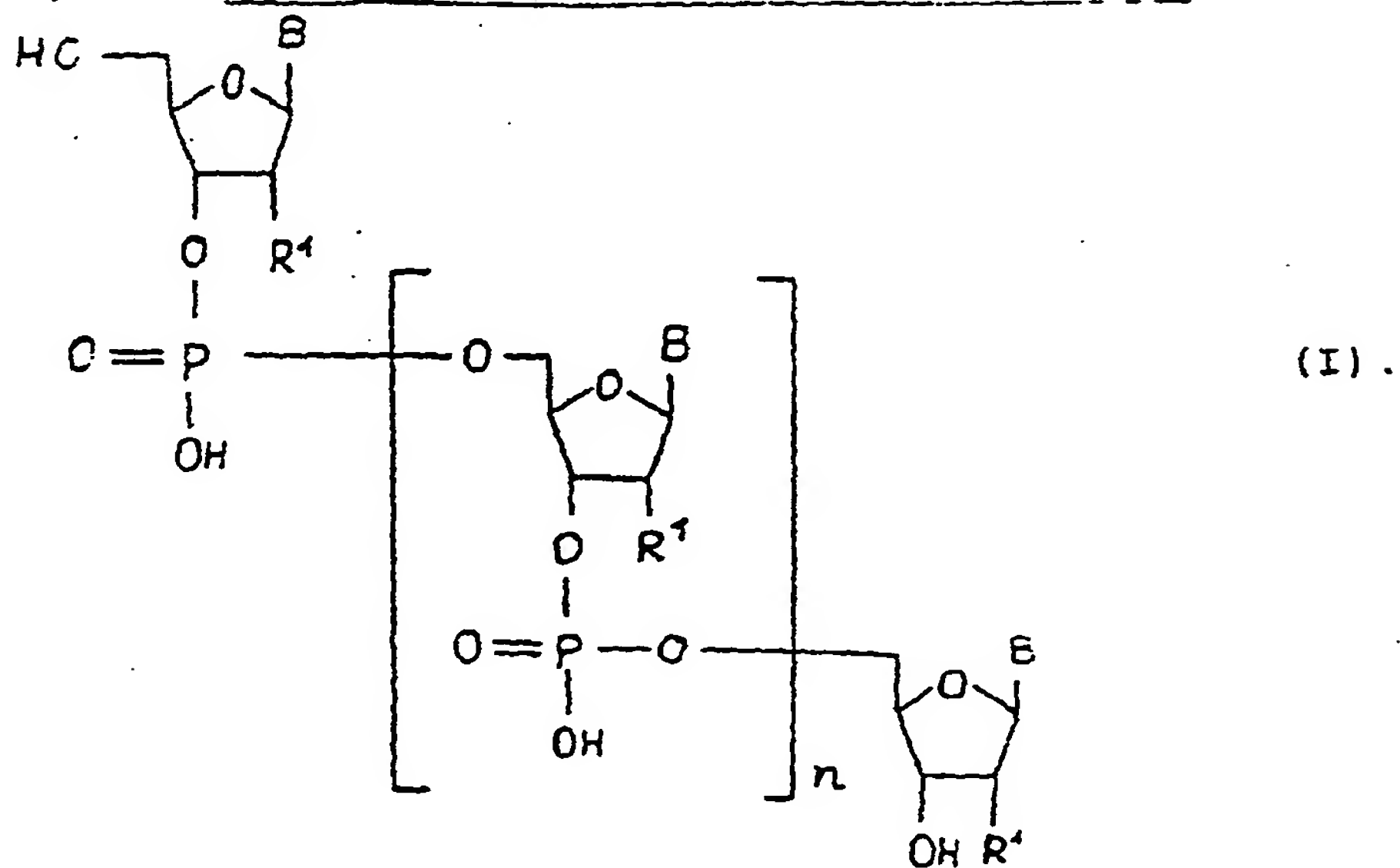


a) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ b) $R_1 = R_2 = \text{H}_3\text{C} \begin{array}{c} \diagup \text{CH} \\ \diagdown \text{C} \end{array}$ c) $R_1 + R_2 = \text{Morpholino}$

= Thymine, 2-(Methyl)benzoylcytosine, Isobutyrylguanine, Benzoyladenine

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden der allgemeinen Formel I



in der

E eine Nucleobase,

8. Wasserstoff, Hydroxyl oder mit in der Nucleotidchemie



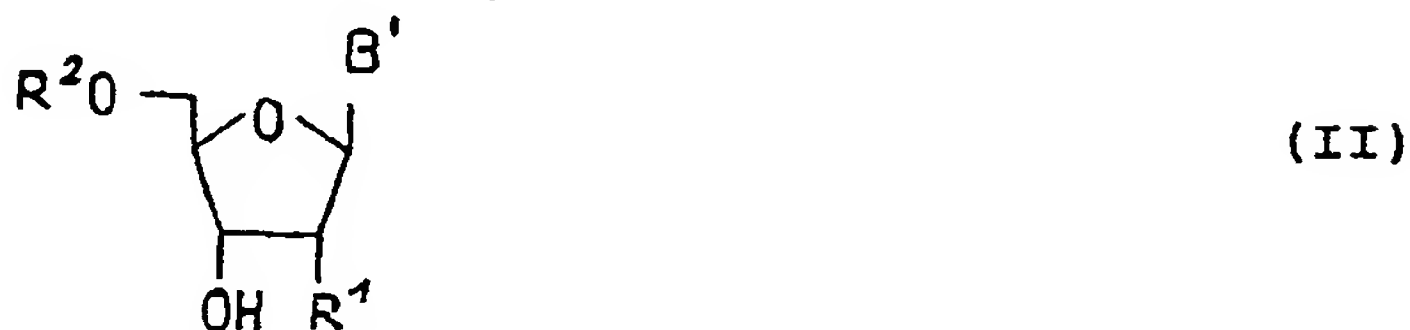
17

üblichen Schutzgruppen geschütztes Hydroxyl und

n eine ganze Zahl von 1 - 200 bedeuten,

mit den folgenden Reaktionsschritten:

a) Umsetzung eines Nucleosids der allgemeinen Formel II



in der

R^1 wie oben definiert ist, sowie

R^2 eine in der Nucleotidchemie übliche Schutzgruppe und

B' die gegebenenfalls mit in der Nucleotidchemie üblichen Schutzgruppen geschützte Nucleobase B bedeuten,

mit einem Phosphinderivat der allgemeinen Formel III



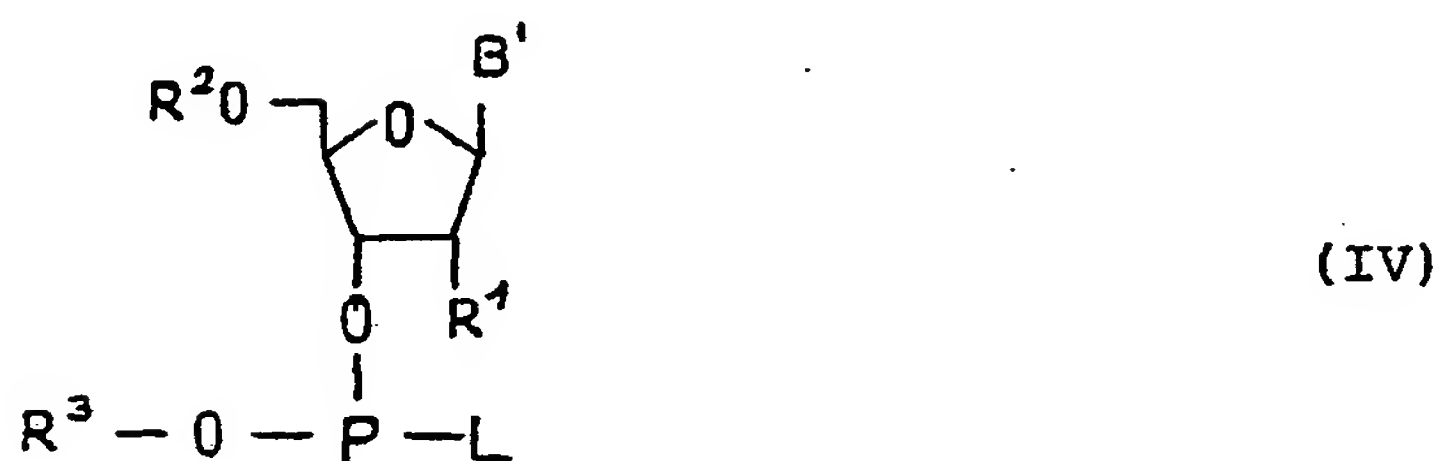
in der R^3 eine abspaltbare Schutzgruppe sowie X und L mit Hydroxylgruppen der Zuckerreste der Nucleotide bzw. Nucleoside reagierende Gruppen sind, in Gegenwart



18

einer Base,

b) Umsetzung des in Schritt a) erhaltenen Nucleotid-derivats der Formel IV

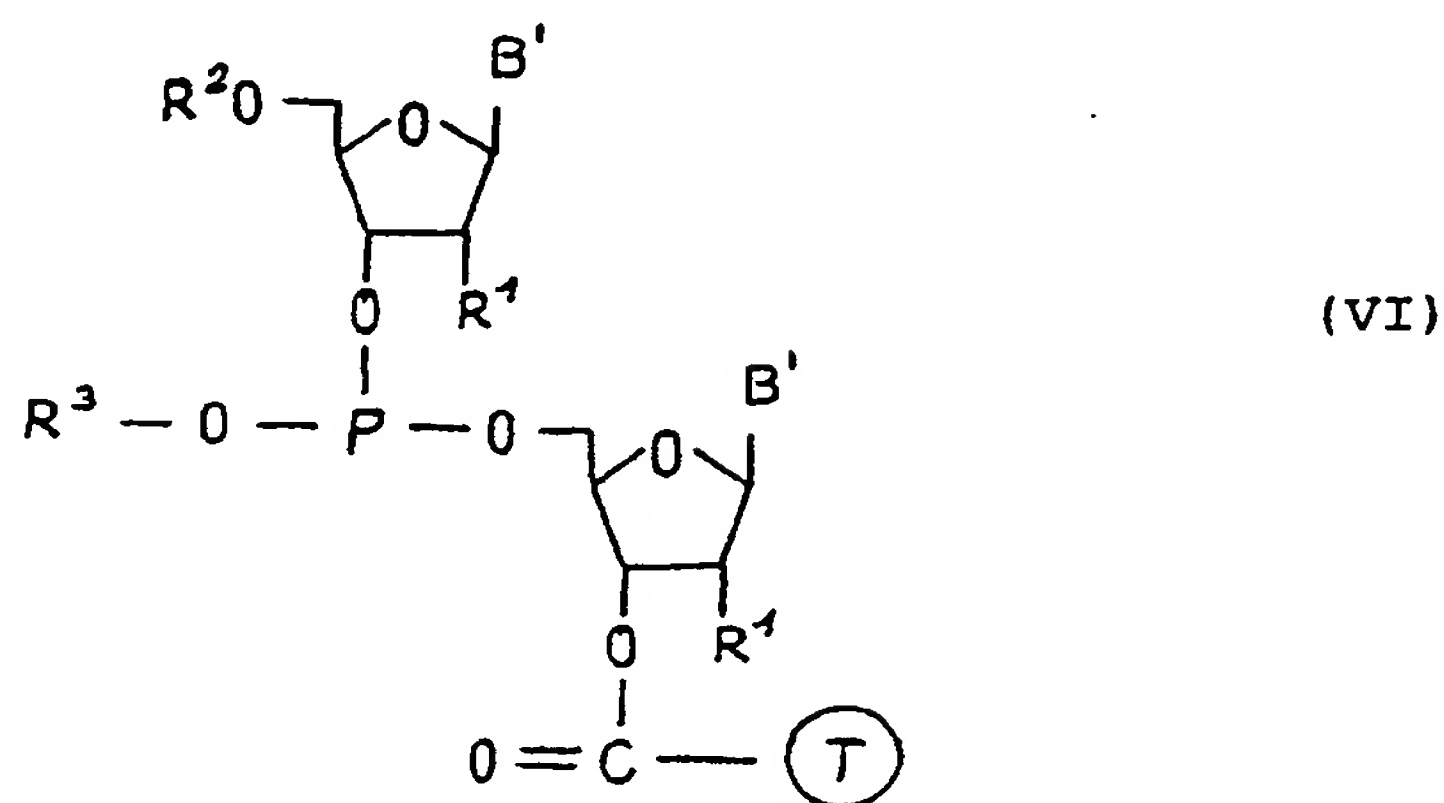


in der B', R¹, R², R³ und L wie oben definiert sind, mit einem an einen polymeren Träger gebundenen Nucleosid der allgemeinen Formel V



in der B' und R¹ wie oben definiert sind und T den polymeren Träger bedeutet,

c) Oxidation des in Schritt b) erhaltenen trägergebundenen Nucleosidonucleotids der allgemeinen Formel VI



in der B', R¹, R², R³ und T wie oben definiert sind, unter Ausbildung von Phosphotriestergruppen.

d) Maskierung freier primärer 5'-OH-Gruppen, die bei der Reaktion gemäß Schritt b) nicht umgesetzt wurden, mit in der Nucleotidchemie üblichen, permanenten Schutzgruppen,

e) Abspaltung der Schutzgruppe R²,

f) gegebenenfalls ein- oder mehrfache Wiederholung der Schritte a) bis e) zur Einführung weiterer Nucleosidphosphat- oder Oligonucleosidphosphateinheiten, sowie

g) Spaltung der Nucleosid-Trägerbindung und gegebenenfalls Abspaltung aller in den Oligonucleosidphosphaten

vorhandenen Schutzgruppen,

dadurch gekennzeichnet, daß

man in Stufe a) als Phosphinderivat der allgemeinen Formel III eine Verbindung verwendet, in der R^3 eine Gruppe der Formel VII



in der

die Gruppen Y, die gleich oder verschieden sein können, Wasserstoff, Methyl und/oder Ethyl und

Z eine elektronenziehende Gruppe darstellen,

wobei in dem Phosphinderivat der Formel III

X Chlor, Brom, CN oder SCN, und

L, CN oder SCN, einen sekundären Aminrest der Formel (VIII)



wobei die Gruppen R^4 primäre, sekundäre oder tertiäre Alkylreste mit 1 - 10 Kohlenstoffatomen sind, oder zusammen einen Cycloalkylrest mit 5 - 7 Kohlenstoff-

atomen, der ein oder zwei Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome als Heteroatome enthalten kann, bilden, oder Imidazol, Triazol, Tetrazol, 3-Nitro-1,2,4-Triazol, Thiazol, Pyrrol, Benztriazol, gegebenenfalls substituiert im Phenylrest, oder Benzhydroxytriazol, gegebenenfalls substituiert im Phenylrest, sind,

bedeuten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phosphinderivat der Formel III einsetzt, in der X Chlor oder Brom und L einen sekundären Aminrest der Formel (VIII)



(VIII)

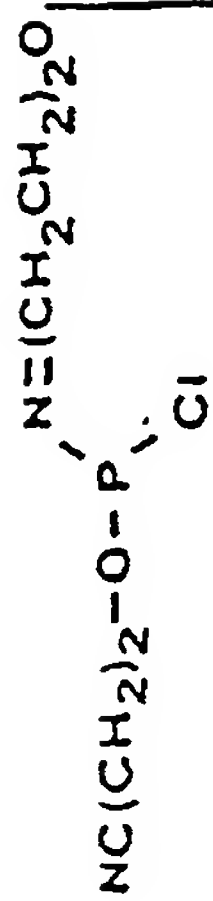
wobei die Gruppen R^4 primäre, sekundäre oder tertiäre Alkylreste mit 1 - 10 Kohlenstoffatomen sind, oder zusammen einen Cycloalkylrest mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen, der ein oder zwei Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome als Heteroatome enthalten kann, bilden, oder Imidazol, Triazol, Tetrazol, 3-Nitro-1,2,4-Triazol, Thiazol, Pyrrol, Benztriazol, gegebenenfalls substituiert im Phenylrest, oder Benzhydroxytriazol, gegebenenfalls substituiert im Phenylrest, sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Phosphinderivat der Formel (III) einsetzt, in der X Chlor, L eine N,N-Dimethyl-, -Diethyl- oder -Diisopropylamino-Gruppe oder N-Morpholinogruppe und R^3 eine β -Cyanethylgruppe ist.



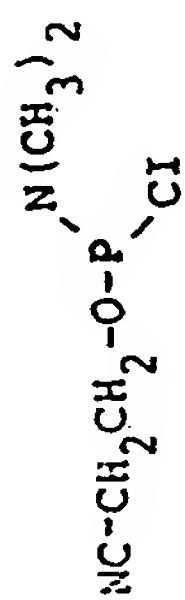
1/3

Fig. 1b



168.12 ppm

Fig. 1a



176.97



Fig. 1c

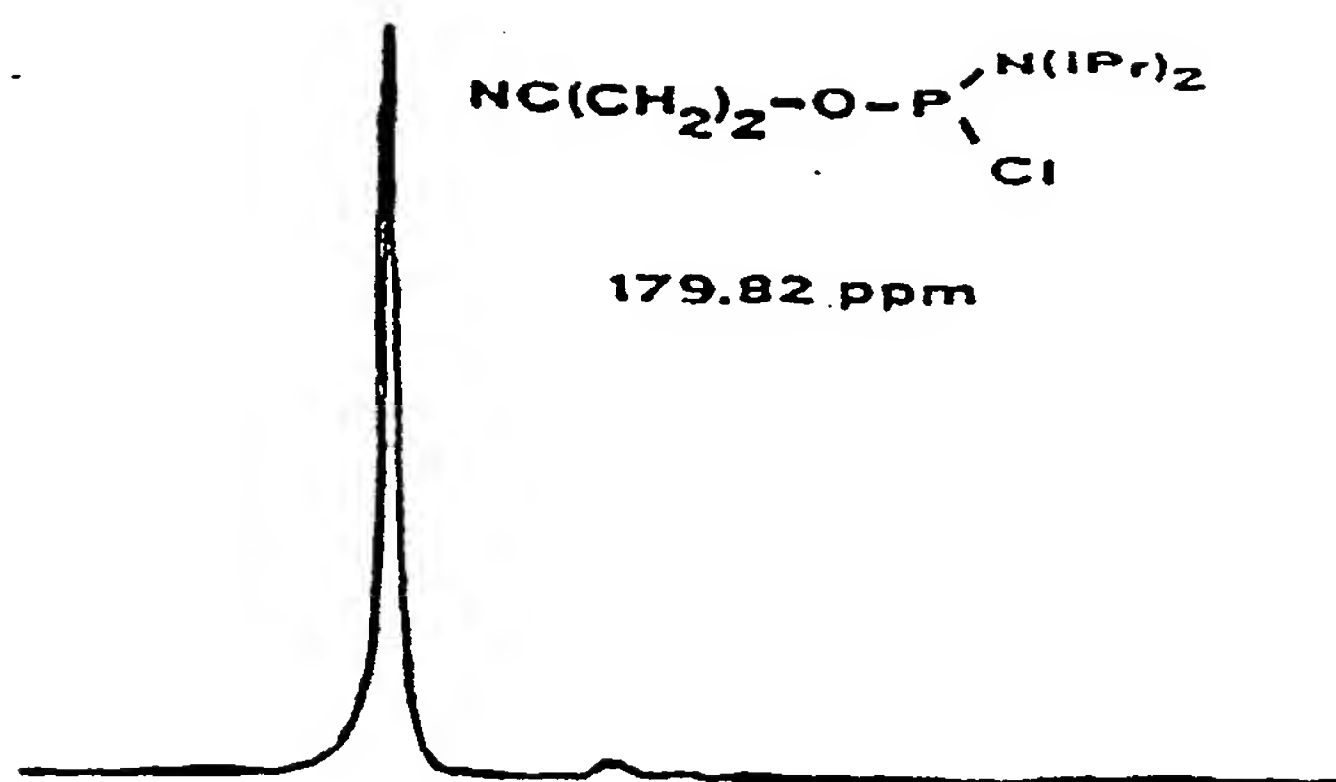
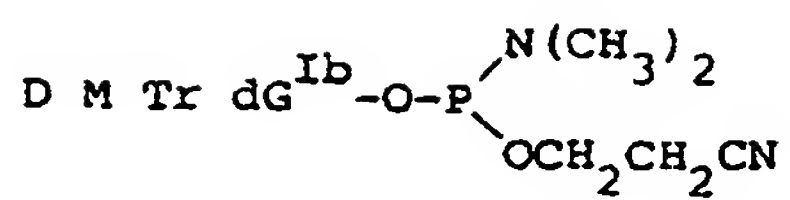


Fig. 2

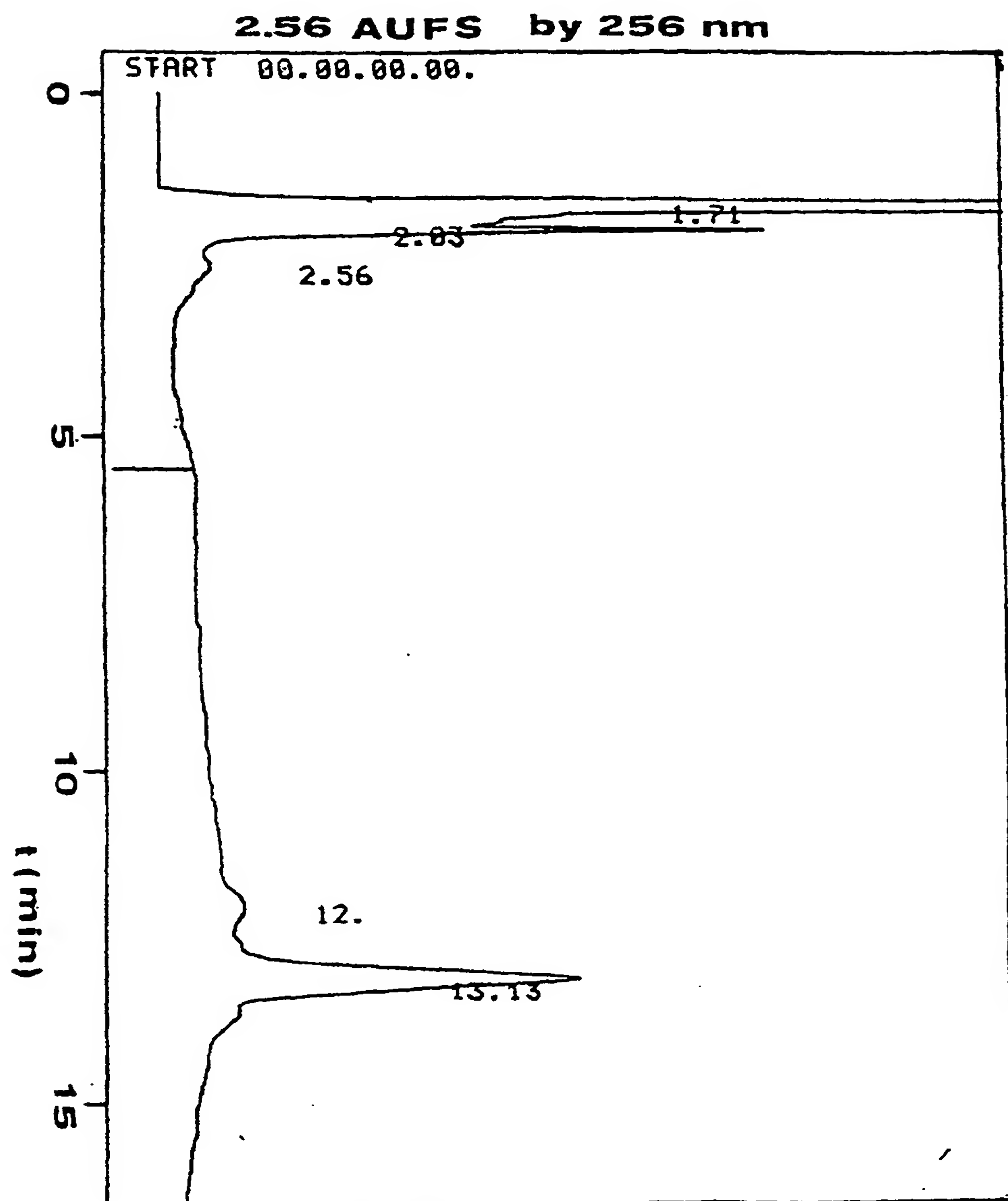


144.965 ppm

145.426 ppm

9,589 ppm

Fig. 3
HPLC des diméthoxytylitierten d (CGRACG)



4/3

Fig. 4

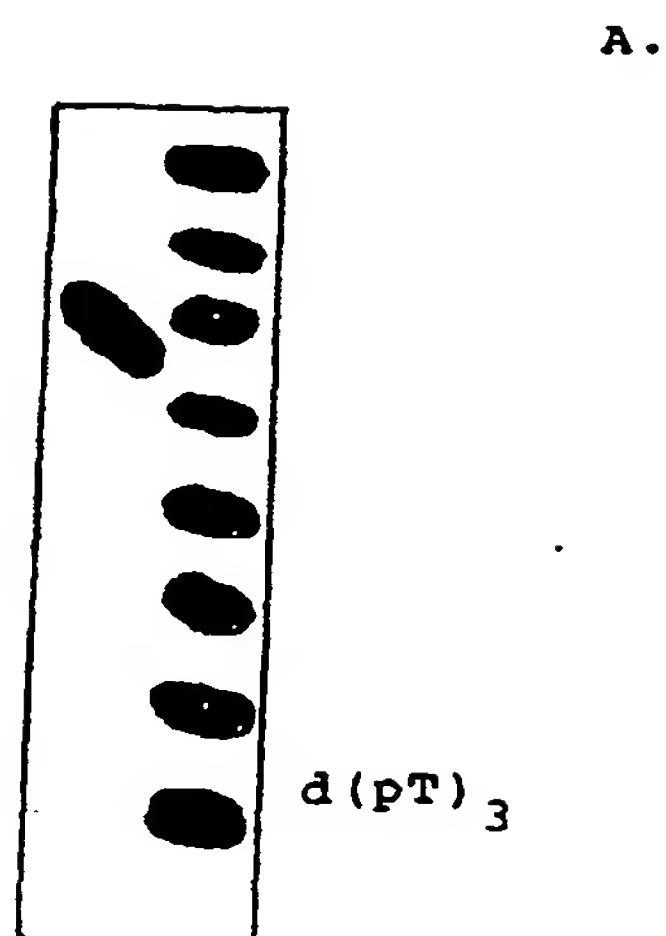
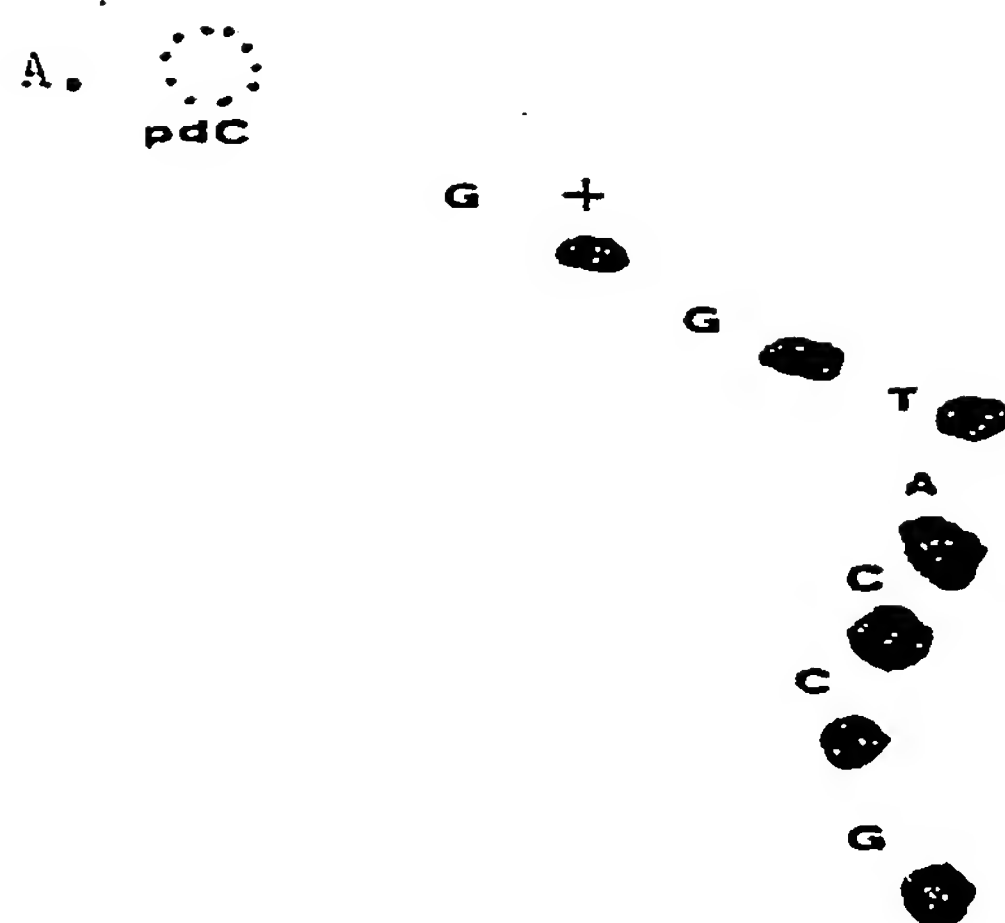


Fig. 5



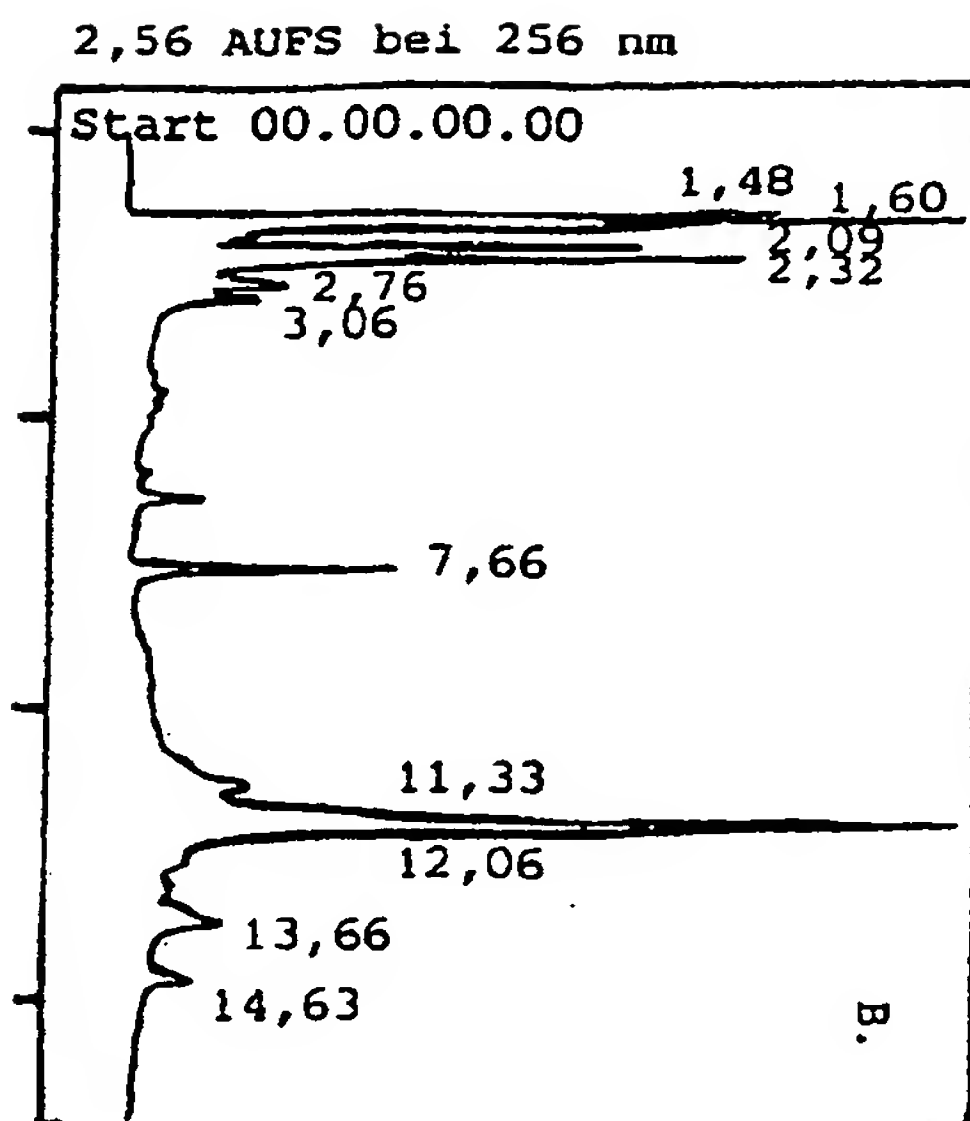


Fig. 6a

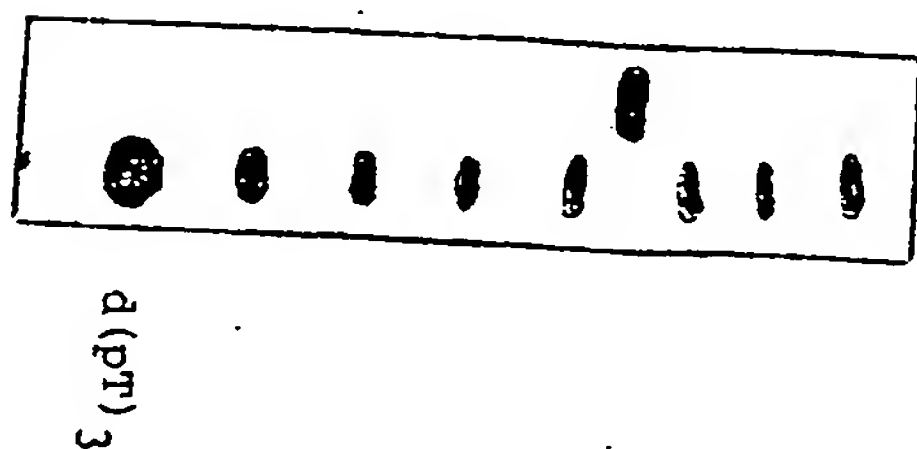


Fig. 6a

B.

Fig. 6c



6/6

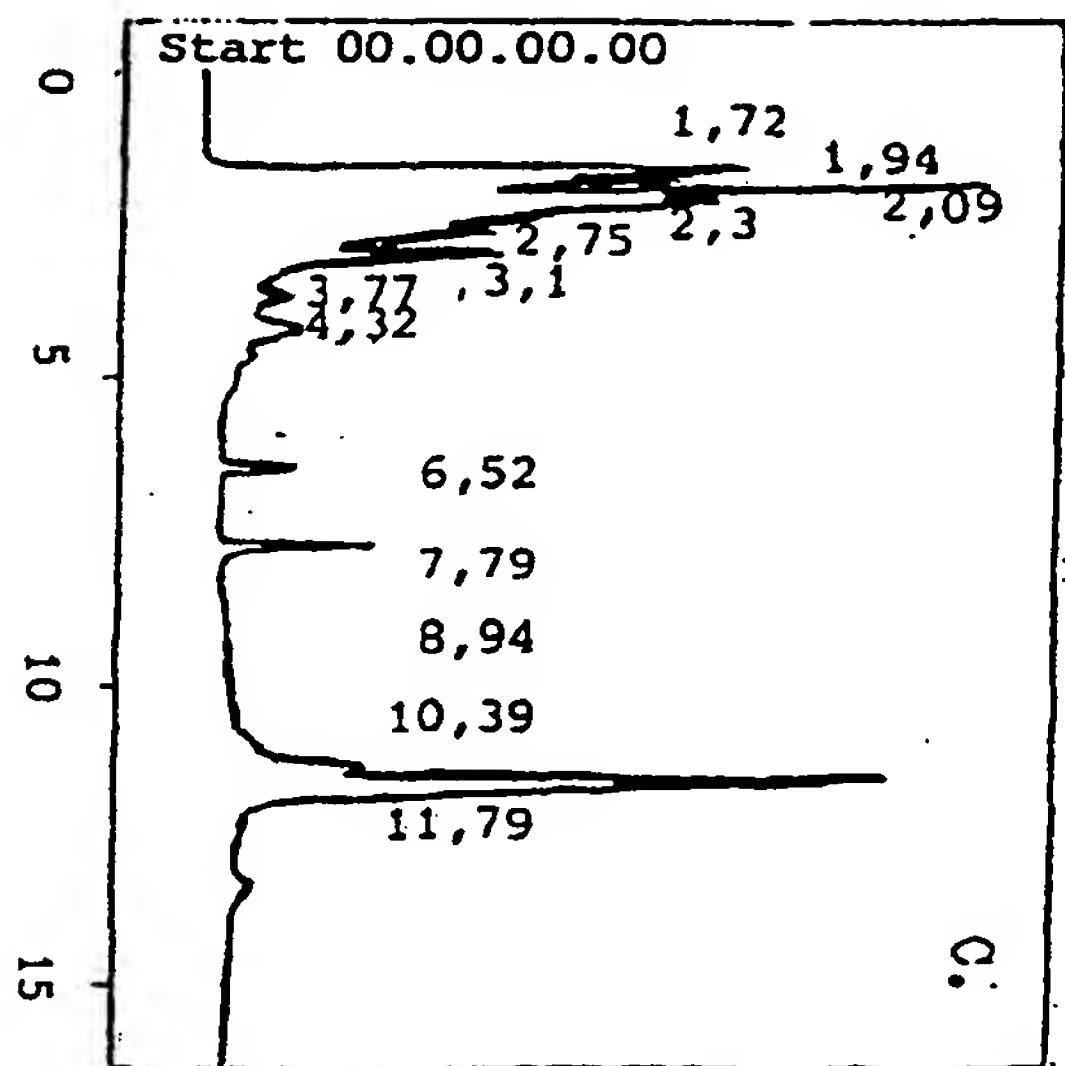


Fig. 7a

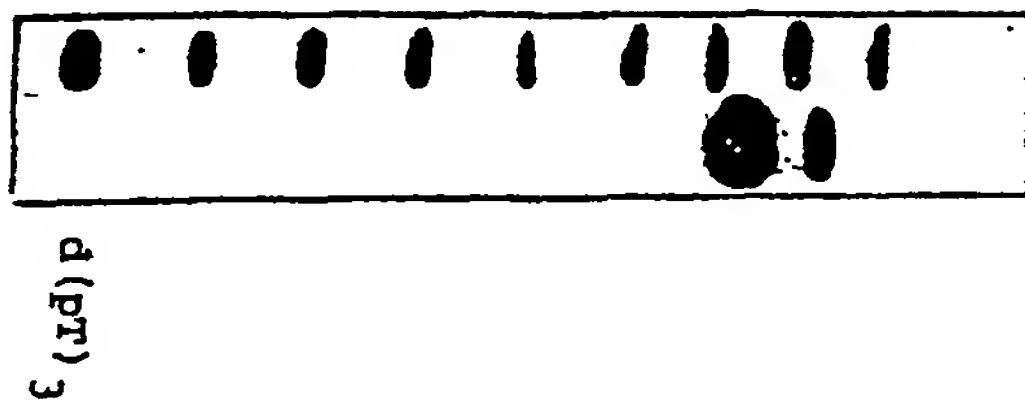


Fig. 7b



Fig. 7c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 84/00244

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ : C 07 H 21/00; C 07 H 19/04; C 07 F 9/26		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 07 H 21/00; C 07 H 19/00; C 07 F 9/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category *	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	Journal of the American Chemical Society, Vol. 98, No. 12, 09 June 1976, R.L. Letsinger et al. 'Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates' pages 3655-3661, see page 3656, Schema 1, page 3657; 2. 2-Trichloroethyl Phosphotriesters - page 3658; cited in the application	1
Y	Chemical Reviews, Vol. 77, No. 2, April 1977, V. Amarnath et al. : 'Chemical synthesis of oligonucleotides' pages 183-217, see pages 194-195	1
Y	EP. A. 0040099 (ENS BIOLOGICALS INC.) 18 November 1981, see pages 1-28	1
Y	Tetrahedron Letters, Vol. 22, No. 20, 1981, S. L. Beaucage et al.; 'Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis: ' pages 1859-1862, see page 1859	1-3
Y	EP. A. 0061746 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 06 October 1982, see pages 1-7	1-3
Y	EP. A. 0090789 (MONSANTO CO.) 05 October 1983, see pages 1-7	1-3
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁶</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ³	Date of Mailing of this International Search Report ³	
09 November 1984 (09.11.84)	28 November 1984 (28.11.84)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ¹⁵	
European Patent Office		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/EP 84/00244 (SA 7744)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/11/84

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0040099	18/11/81	JP-A- 57009797	19/01/82
EP-A- 0061746	06/10/82	JP-A- 57176998	30/10/82
		AU-A- 8199782	30/09/82
		US-A- 4415732	15/11/83
EP-A- 0090789	05/10/83	JP-A- 58180500	21/10/83

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 84/00244**

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 84/00244**

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Oktober 1981)

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (FORTSETZUNG VON BLATT 2)		
Art	Bezeichnung der Veröffentlichung ¹ soweit erforderlich unter Angabe der maßgebenden Teile ¹⁷	Bet. Anspruch Nr. ¹⁸
	phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis", Seiten 1859-1862, siehe Seite 1859 --	1-3
Y	EP, A, 0061746 (UNIVERSITY PATENTS INC.) 06. Oktober 1982, siehe Seiten 1-7 --	1-3
Y	EP, A, 0090789 (MONSANTO CO.) 5. Oktober 1983, siehe Seiten 1-7 -----	1-3

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/EP 84/00244 (SA 7744)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 22/11/84

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0040099	18/11/81	JP-A- 57009797	19/01/82
EP-A- 0061746	06/10/82	JP-A- 57176998	30/10/82
		AU-A- 8199782	30/09/82
		US-A- 4415732	15/11/83
EP-A- 0090789	05/10/83	JP-A- 58180500	21/10/83

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.